

Cryptococcus neoformans inhibits nitric
oxidesynthesis caused by
CpG-oligodeoxynucleotidestimulated macrophages
in a fashion independent of capsular
polysaccharides(Cryptococcus neoformansは莢膜
多糖体非依存症にCpG-オリゴデキシヌクレオチドに
よるマクロファージからの一酸化窒素産生を抑制す
る)

著者	肖 剛
号	78
学位授与番号	3422
URL	http://hdl.handle.net/10097/45942

氏 名 (本籍)	肖 ^{ショウ}	剛 ^{ゴウ}
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)	
学 位 記 番 号	医 第 3 4 2 2 号	
学位授与年月日	平 成 20 年 9 月 10 日	
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 2 項該当	
最 終 学 歴	1998 年 12 月 10 日 香港中文大学研究院 Chemical pathology 専攻修了	
学 位 論 文 題 目	<p><i>Cryptococcus neoformans</i> inhibits nitric oxide synthesis caused by CpG-oligodeoxynucleotide-stimulated macrophages in a fashion independent of capsular polysaccharides</p> <p>(<i>Cryptococcus neoformans</i> は莢膜多糖体非依存性に CpG- オリゴデオキシヌクレオチドによるマクロファージからの一酸化窒素産生を抑制する)</p>	
	(主 査)	
論 文 審 査 委 員	教授 賀 来 満 夫	教授 押 谷 仁
	教授 服 部 俊 夫	

論文内容要旨

クリプトコッカスはエイズなど易感染性宿主に重篤な髄膜脳炎を引き起こすことが知られている日和見病原真菌である。本真菌は細胞内増殖菌であり、その感染防御にはインターフェロン γ (IFN- γ) など Th1 サイトカインによって誘導される細胞性免疫の存在が重要である。マクロファージは IFN- γ によって活性化を受け、誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase: iNOS) の発現が誘導され、その結果産生される NO によって貪食したクリプトコッカスを殺菌する。また、これまでの検討から、非メチル化 CpG オリゴデオキシヌクレオチド (CpG-ODN) をクリプトコッカス感染マウスに投与すると、IFN- γ 産生を誘導して感染防御に働くことが明らかにされている。このような背景から、本研究では、クリプトコッカス感染が肺胞マクロファージの NO 産生及び殺菌活性にどのような影響を与えるかの検討を行った。

方法としては、マウス肺胞マクロファージ細胞株である MH-S を IFN- γ の存在下で CpG-ODN で刺激した。この系に厚い莢膜を有する高病原性株のクリプトコッカスを加えると MH-S からの NO 産生が抑制され、この抑制は iNOS mRNA 発現の低下によることが明らかになった。また、莢膜欠損変異株 Cap67 とその親株である莢膜産生株 B3501 でもその抑制効果に差がみられなかったことから、この抑制に莢膜は必須ではないと考えられた。さらに、Cap67 と MH-S の間にニトロセルロース膜を介在させると抑制活性が消失したことから、クリプトコッカスとマクロファージが接触あるいは近接することが重要であることがわかった。このような抑制は NO 産生のみにとどまらず、MH-S によるクリプトコッカスの増殖抑制活性においても同様に観察された。Cap67 による NO 産生抑制効果は加熱により完全に消失したが、Cap67 破砕物ではそのような影響は受けなかった。Cap67 破砕物の結果から何らかの脂質が抑制活性に関与していないか検討したが、Cap67 から得られた中性脂質、リン脂質にはそのような活性は検出できなかった。最後に、Cap67 破砕物が CpG-ODN の Toll-like receptor (TLR9) を介した NF κ B の活性化に与える影響を検討するために、HEK 293 細胞に TLR9 の遺伝子を導入して NF κ B の活性化をルシフェラーゼアッセイで解析したところ、TLR9 シグナルの経路の抑制は見られなかったが、LPS 刺激による TLR4 経路の抑制は観察された。

これらの結果から、クリプトコッカスは IFN- γ 存在下での CpG-ODN による肺胞マクロファージからの NO 産生を莢膜非依存性に抑制することが明らかになった。詳細な機序については、今後のさらなる検討を有するものと考えられた。

審査結果の要旨

クリプトコッカスはエイズなど易感染性宿主に重篤な髄膜脳炎を引き起こすことが知られている日和見病原真菌である。本真菌は細胞内増殖菌であり、その感染防御にはインターフェロン γ (IFN- γ) など Th1 サイトカインによって誘導される細胞性免疫の存在が重要である。マクロファージは IFN- γ によって活性化を受け、誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase: iNOS) の発現が誘導され、その結果産生される NO によって貪食したクリプトコッカスを殺菌する。また、これまで、非メチル化 CpG オリゴデオキシヌクレオチド (CpG-ODN) をクリプトコッカス感染マウスに投与すると、IFN- γ 産生を誘導して感染防御に働くことが明らかにされている。このような背景から、本研究は、クリプトコッカス感染が肺胞マクロファージの NO 産生及び殺菌活性にどのような影響を与えるかの基礎的検討を行ったものである。

本研究ではまず、マウス肺胞マクロファージ細胞株 (MH-S) を IFN- γ の存在下で CpG-ODN 刺激する系に厚い莢膜を有する高病原性株のクリプトコッカスを加えたところ、MH-S からの NO 産生が抑制され、この抑制は iNOS mRNA 発現の低下によることを明らかにした。また、莢膜欠損変異株 Cap67 とその親株である莢膜産生株 B3501 でもその抑制効果に差がみられなかったことから、この抑制に莢膜は必須ではないと考えられた。さらに、Cap67 と MH-S の間にニトロセルロース膜を介在させると抑制活性が消失したことから、クリプトコッカスとマクロファージが接触あるいは近接することが重要であることがわかった。このような抑制は MH-S によるクリプトコッカスの増殖抑制活性においても同様に観察された。Cap67 による NO 産生抑制効果は加熱により完全に消失したが、Cap67 破砕物ではそのような影響は受けなかった。Cap67 破砕物の結果から何らかの脂質が抑制活性に関与していないか検討したが、Cap67 から得られた中性脂質、リン脂質にはそのような活性は検出できなかった。最後に、クリプトコッカスが CpG-ODN の Toll-like receptor (TLR9) を介した NF κ B の活性化に与える影響を検討するために、HEK 293 細胞に TLR9 遺伝子を導入し NF κ B の活性化をルシフェラーゼアッセイで解析する実験を行ったところ、Cap67 破砕物は TLR9 による活性化シグナルを抑制しないことが明らかになった。これらの結果から、クリプトコッカスは IFN- γ 存在下での CpG-ODN による肺胞マクロファージからの NO 産生を莢膜非依存性に抑制することが解明された。今後、クリプトコッカスによる NO 産生抑制の詳細な機序についてさらなる検討が期待される。

以上、本研究では、クリプトコッカスがマクロファージの殺菌から逃れて生存するためのエスケープ機構に関する重要かつ新規な知見を有しており、審査の結果、本論文内容が十分学位に値することが確認された。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。

